

7个蔷薇科物种HPL基因家族的鉴定和特性分析

徐博文, 李乐跃, 李梦*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要:【目的】利用生物信息学方法对7个蔷薇科HPL基因家族进行分析,以期更深入地了解蔷薇科HPL家族基因特性,在分子水平上为蔷薇科品种的研究和改良提供候选基因。【方法】用拟南芥HPL基因鉴定白梨、苹果、桃、草莓、西洋梨、黑树莓、梅七种蔷薇科物种的HPL基因,分析HPL基因的结构、保守域、系统进化关系、正选择作用、共线性关系和表达情况。【结果】鉴定确定了31个HPL基因,其中白梨6个,苹果4个,桃3个,草莓5个,西洋梨4个,黑树莓6个,梅3个;大多包含1个或3个内含子;系统进化树显示,HPL基因家族分为A、B和C3个亚族;进化树上9个节点M0模型的 ω 都远小于1,平均数为0.1748;梨、苹果、桃和梅HPL基因间存在较强的共线性关系;梨和苹果果实中检测到HPL基因表达。【结论】鉴定了7个蔷薇科物种共31个HPL基因,每个物种均不少于3个,正选择效应在HPL基因上作用明显。苹果的MDP0000424398、MDP0000225501和梨的Pbr041820.1为表达活跃的功能基因。梨主要表达的HPL基因属于C亚族,苹果主要表达的HPL基因属于B亚族。

关键词: 蔷薇科; 脂氢过氧化物裂解酶; HPL; 基因家族; 系统进化

中图分类号:S66 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2020)04-0459-13

Identification and characteronation of hydroperoxide lyase (HPL) gene family in seven species of Rosaceae

XU Bowen, LI Leli, LI Meng*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract:【Objective】HPL is not only related to the formation of aroma of multiple fruits and vegetables, but also plays a core role in inducing plant defense as part of the metabolic pathway of lipoxygenase, and is related to physiological processes such as plant resistance to disease, insect, injury, stresses, storage and aging. This study used bioinformatics method to identify HPL gene family of Rosaceae and analyze the characteristics of HPL, so as to have a better understanding of the HPL gene family of Rosaceae, and provide clear candidate genes for the improvement of Rosaceae varieties at the molecular level.【Methods】By known Arabidopsis HPL genes and their encoded protein sequence, we retrieved the genome database of 7 Rosaceae species including *Pyrus bretschneideri*, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Fragaria vesca*, *Pyrus communis*, *Rubus occidentalis* and *Prunus mume* to identify the HPL candidate genes. Then NCBI was used to compare the candidate sequences for conserved domains. ProtParam was used to predict the physicochemical properties of HPL proteins. Then all HPL gene structures and motifs were analyzed by online software GSDS 2.0 and MEME. ClustalW was employed to perform multiple sequence comparison analysis on the amino acid sequences of the obtained HPL gene family, and phylogenetic trees was generated with neighbor-joining method by MEGA 6 software. Nine nodes were selected from the protein phylogenetic tree, the value of dN/dS (ω) for each node was calculated by the CODEML program of PAML 4 software, and the “site-specific” model was used to identify the amino acid sites experiencing positive selection. MCScanX was used to detect the collinearity of the

收稿日期:2019-10-08 接受日期:2020-01-09

基金项目:南京农业大学校级教育教学改革研究项目园艺品牌专业专项(2019P007);江苏省自然科学基金面上项目(BK20171374)

作者简介:徐博文,男,本科,研究方向为果树基因组学。Tel:19916947760, E-mail:746817618@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:025-84395262, E-mail:mli@njau.edu.cn

HPL gene. Furthermore, *HPL* gene expression of pear and apple were examined.【Results】In this study we identified 33 *HPL* homologous genes, 6 from pear, 4 from apple, 3 from peach, 5 from strawberry, 4 from European pear, 6 from black raspberries, 3 from mume and 2 from *Arabidopsis thaliana*. MEME results showed that 31 *HPL* genes contained 10 motifs, and only *AT4G15440.1* lacked motif1 and motif3, indicating that *HPL* gene family members were highly conserved during evolution, and member expansion was mainly related to whole genome replication events. Analysis of all *HPL* gene structures showed that the *HPL* gene had a simple structure and most *HPL* genes contained one or three CDS. Phylogenetic trees divided the *HPL* genes of Rosaceae species and *Arabidopsis* into three subgroups. Subgroup B and C contained one *Arabidopsis* *HPL* gene. Subgroup A and C contained *HPL* genes from all seven Rosaceae species, and subgroup B contained *HPL* genes from six Rosaceae species. Among the 9 tested nodes, 7 nodes showed significant positive selection, indicating that positive selection played an important role in the evolution of *HPL* genes. Among these *HPL* genes, the distribution of positive selection sites estimated by Bayesian method under the M8 model was very scattered and the rule was not obvious, which indicated that point mutations with positive selection effect played an indispensable role in the evolution of *HPL* gene family. Nine collinearity relationships between white pear and six other species of Rosaceae were identified by MCScanX, including three pairs of collinearity of peach and mei, two pairs of collinearity of European pear and one pair of collinearity of apple. This was also related to the shorter differentiation time of these species. The expression results of pear and apple showed that the expression level of *Pbr041820.1* of pear in subgroup C was 2-6 times higher than that of *Pbr020059.1* of subgroup B in different periods, and 4 *HPL* in subgroup A was not expressed. In apple *HPL* expressed more in wild material than that of cultivar. Apple MDP0000132456 was located in the A subfamily, which was hardly expressed. And the MDP0000424398 and MDP0000225501 in the B subfamily were expressed.【Conclusion】In this study, a total of 31 *HPL* genes were identified from seven species of Rosaceae. Each species no less than 3 genes. Positive selection had significant effect on *HPL* gene. *Mdp0000424398*, *mdp0000225501* and *pbr041820.1* of apple and pear were active expression genes. The active *HPL* gene of pear belonged to C subgroup, the active *HPL* gene of Apple belonged to B subgroup.

Key words: Rosaceae; Lipoperoxide lyase; *HPL*; Gene family; Phylogeny

蔷薇科物种种类繁多,包含苹果、梨、桃等重要果树,产值和种植面积在世界果树中均居前列,其中苹果和梨在中国果园总面积和总产量中分别位居第二和第三位。蔷薇科约有 124 个属 3 300 余种,经济价值高,其中苹果、梨、桃、李、杏、梅等在世界市场上深受欢迎,具有重要的经济意义。随着全球经济的快速发展,水果产量不断提高,人们开始注重水果品质的提升,尤其是果品风味。果品风味是生物化学上高度复杂的特性,涉及糖、酸和香气的相互作用。香气作为风味的重要组成部分,受到越来越多的重视。水果香气是由 1 000 多种挥发性化合物组成的复杂混合物,包括酯类、醛类、萜烯类、醇类、羰基类和一些硫类化合物^[1-2],各香气成分

的种类和相对比例决定了不同水果的特定香气。

目前研究表明,植物风味挥发物(如酯类、醇类和醛类)主要来源于饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。直链醇、醛、酮、酸、酯、内酯类这些从脂肪酸中提取出的非挥发性前体,主要通过脂氧合酶的脂肪酸氧化途径形成,而脂肪酸的脂氧合酶途径至少包括 4 种酶,分别是脂氧合酶(*LOX*)、过氧化氢裂解酶(*HPL*)、醇脱氢酶(*ADH*)和醇乙酰转移酶(*AAT*)^[3],这四种酶形成饱和和不饱和 C6 和 C9 醛。

研究表明,*HPL* 属于细胞色素 P450(CytP450)类蛋白质家族中的 CYP74 亚家族。根据底物过氧基位置的差异,*HPL* 可分为 9-*HPL* 和 13-*HPL*,CYP74 酶的 CYP74C 亚群由许多植物物种的 9/13-

HPLs 组成。这些 *HPLs* 产生短链醛(C6 或 C9)和相应的 C12 或 C9 草酸,其中短链挥发性醛和相应的醇具有芳香气味。9/13-*HPLs* 已在许多园艺作物中被发现,如黄瓜^[4-5]、茶叶^[6]、葡萄^[7]、和苹果^[8]。13-*HPLs*(CYP74B)可以催化亚油酸或亚油酸衍生的 13-HPOD/T 的裂解,从而产生 C6 GLVs。GLVs 是一类来源于多不饱和脂肪酸氧化的生物活性氧化脂类,是陆地植物中常见的挥发性有机化合物(VOCs)^[9]。

1976 年 Vick^[10]首次从西瓜幼苗中发现脂氢过氧化物裂解酶(hydroperoxide lyase, *HPL*)。*HPL* 通过催化 *LOX* 的反应产物——脂氢过氧化物裂解生成短链醛(醇)和 C12 含氧酸,其中短链醛(醇)是许多水果和蔬菜香气的组成部分,从而影响果实的风味,C12 含氧酸中的愈伤素能诱导伤口细胞快速生长并参与伤口应激反应^[11],并且作为脂氧合酶的代谢途径的一部分,*HPL* 在引发植物防御中起着核心作用,参与植物的抗病虫、抗伤害、抗逆反应和贮藏、老化等生理进程,通过 *LOX/AOS* 支路,生成能激活植物防御系统中相关基因转录的茉莉酸^[12]。*HPL* 的 cDNA 全长序列由 Matsui 等^[13]于 1996 年首先从辣椒中获得,后来人们陆续从拟南芥^[14]、黄瓜^[15]和马铃薯^[16]等多种植物中得到 *HPL* 的 cDNA 序列。

为了发掘蔷薇科物种中 *HPL* 家族的结构和进化历程,加深对香气重要基因 *HPL* 的了解,笔者设计如下试验:以蔷薇科物种白梨(*Pyrus bretschneideri*)^[17]、苹果(*Malus domestica*)^[18]、桃(*Prunus persica*)^[19]、草莓(*Fragaria vesca*)^[20]、西洋梨(*Pyrus communis*)^[21]、黑树莓(*Rubus occidentalis*)^[22]和梅(*Prunus mume*)^[23]为研究对象,通过对已获得的植物 *HPL* 结构域的检索,鉴定蔷薇科物种基因组内的 *HPL* 基因,并分析蔷薇科 *HPL* 基因的基本结构;对蔷薇科 *HPL* 基因所编码的蛋白质进行多序列联配,使用拟南芥作为外群,构建系统发生树,比较蔷薇科 *HPL* 基因之间的进化关系;分析蔷薇科 *HPL* 基因的功能性分歧和正选择作用;鉴定不同物种 *HPL* 基因之间的共线性关系;并以白梨和苹果为例研究 *HPL* 基因的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料

苹果('Golden Delicious')、桃('Lovell')、草莓

('Hawaii 4')、西洋梨('Bartlett')、黑树莓('ORUS 4115-3')的基因组数据来自 GDR(<https://www.rosaceae.org/>) , 分别为 GDR1.0、GDR2.0a1、GDR4.0、GDR1.0、GDR1.0al 版本。白梨('Dangshansuli')基因组数据来自 GigaDB (<http://gigadb.org/>), 版本为 gigadb121010; 梅('Mei')基因组数据来自梅基因组数据库 (<http://prunusmumegenome.bjfu.edu.cn>), 版本为 BFU1.0; 拟南芥('Col-0')基因组数据来自 EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) TAIR10 版本。

1.2 基因组水平上鉴定蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 基因

获取拟南芥中已鉴定的 *HPL* 基因以及它们编码的蛋白质序列,将这些序列作为检索初始序列,在拟南芥及蔷薇科 7 个物种基因组数据库中进行 blastp, 从检索结果中筛选出 E≤1e-10 的蛋白质序列,作为候选 *HPL* 基因。然后再次使用 NCBI 对候选序列进行保守结构域的比对^[24],含有 NCBI 中拟南芥 *HPL* 保守结构域 PLN02648 的候选序列即确认为 *HPL* 基因。利用在线软件 ProtParam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)预测 *HPL* 蛋白的理化性质。

1.3 蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 基因序列结构分析

使用 ClustalW 对获得的 *HPL* 基因家族的氨基酸序列进行多重序列比对。将 *HPL* 基因家族的氨基酸序列载入程序中,设置比对参数为默认。通过在线软件 GSDS 2.0^[25](<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析所有 *HPL* 基因结构。使用 MEME 软件^[26](<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测 *HPL* 基因的基序(motif),最大基序数设置为 10。

1.4 蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 基因的系统进化分析

使用 MEGA 6 软件^[27]对上述 *HPL* 蛋白家族氨基酸序列进行多重比对,使用 Neighbor-Joining 方法构建系统发生树,参数设置默认。

1.5 蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 基因的正选择作用分析

笔者使用 Yang 等^[28]研究并发展的极大似然法以及密码子替换模型的正选择位点分析方法软件 PAML。将每个选择节点里的序列通过 ClustalW 多序列联配,然后使用在线软件 PAL2NAL^[29](<http://www.bork.embl-heidelberg.de/pal2nal/>)转换为编码序列去除空位(gap)后的多序列联配。通过 PAML

4 软件^[30]的 codeml 程序计算每个节点对应的 dN/dS (ω)值。在蛋白质系统发生树和序列对位排列结果基础上,通过“位点特异性”模型鉴定氨基酸序列中经历正选择作用的系统发生树节点和氨基酸位点。当似然比结果符合卡方分布时,通过似然比测验分析得到嵌套间差异的显著性。通过计算 M3 模型对 M0 模型的似然比来检测位点间是否具有选择压力的差异;通过计算 M8 模型对 M7 模型的似然比来检测位点间是否具有正选择压力,其中 M8 模型和 M7 模型均使用离散 β 分布来估计每个位点的 ω 值。并且当 M8 模型对 M7 模型的统计检验结果达到显著,M8 模型下 $\omega>1$,使用贝叶斯的后验概率分布方法估计经历正选择作用的位点^[28]。

1.6 蔷薇科物种和拟南芥 HPL 基因的共线性分析

通过 blastp 比对,寻找不同蔷薇科物种两两之间潜在的同源基因对($E\leq 1e-10$),用 Python 脚本将 gff 文件转换成 MCscanX^[31]所能识别的格式,然后将比对好的文件和转变格式后的 gff 文件导入 MCscanX,得到基因共线性信息和染色体片断共线性信息。

1.7 梨和苹果 HPL 基因的表达分析

为了检测 HPL 基因在梨中的表达,分别于梨果实的幼果期(2014 年 5 月 6 日)、膨大期(2014 年 6 月 30 日)和成熟期(2014 年 9 月 6 日)在南京农业大学实验基地收集了梨野生品种‘豆梨’和栽培品种‘砀山酥梨’的果实。于苹果果实的幼果期(2014 年 5 月 6 日)、膨大期(2014 年 6 月 6 日)和成熟期(2014 年 9 月 17 日)在中国农业科学院郑州果树研究所采集苹果野生品种‘西府海棠’和栽培品种‘金

冠’的果实。每个阶段采果至少 3 个,将样品切成小块并储存于-80 °C 冰箱中,后用于转录组测序,表达水平单位使用 TPM(Transcripts Per Million)。

2 结果与分析

2.1 7 个蔷薇科物种中 HPL 基因的鉴定

在 8 个物种中共鉴定出 HPL 基因 33 个,其中白梨 6 个、苹果 4 个、桃 3 个、草莓 5 个、西洋梨 4 个、黑树莓 6 个、梅 3 个和拟南芥 2 个(表 1)。蔷薇科物种中,HPL 的数量和基因组大小有一定的关系,基本上基因组越大 HPL 的数量越多。蔷薇科物种和拟南芥 HPL 基因的基本信息(表 2)显示,HPL 基因氨基酸序列长度除草莓 FvH4_2g07430.1 和黑树莓 Bras_T16557 在 1 000 bp 左右外,其余均在 500 bp 左右。草莓的 5 个 HPL 基因有 3 个位于 2 号染色体,黑树莓的 6 个 HPL 基因有 4 个位于 BrasperryS0183,其余 6 个物种在染色体上分布不均。预测的分子质量除草莓 FvH4_2g07430.1 和黑树莓 Bras_T16557 在 100 ku 以上,AT4G15440.1 在 50 ku 以下,其余均在 55 ku 左右。理论等电点为 5.64~9.10,并且每个物种均既有酸性也有碱性的 HPL。

2.2 7 个蔷薇科物种和拟南芥中 HPL 基因序列结构分析

通过 MEME 软件预测所有潜在的保守性基序(motif),最终提取出 10 个基序,并得到蔷薇科物种和拟南芥 HPL 蛋白中的基序及其在蛋白质中的位置(图 1)。结果显示 31 个 HPL 基因均含有 10 个 motif,仅 AT4G15440.1 缺少 motif1 和 motif3,这说明 HPL 基因家族成员具有较高的保守性。

表 1 7 个蔷薇科物种和拟南芥基因组信息
Table 1 Genomic information of 7 species of Rosaceae and Arabidopsis

物种 Species	染色体数 Chromosome number	版本 Release version	基因组基因数 Genome gene number	HPL 基因数 Identified HPL genes	基因前缀 Gene name prefix
白梨 <i>Pyrus bretschneideri</i>	34	gigadb,v121010	42 341	6	Pbr
苹果 <i>Malus domestica</i>	34	GDR,v1.0	63 541	4	MDP
桃 <i>Prunus persica</i>	16	GDR,v2.0.a1	26 873	3	Prupe
草莓 <i>Fragaria vesca</i>	14	GDR,v4.0	28 588	5	FvH
西洋梨 <i>Pyrus communis</i>	34	GDR,v1.0	43 419	4	PCP
黑树莓 <i>Rubus occidentalis</i>	14	GDR,v1.0	28 005	6	Bras
梅 <i>Prunus mume</i>	16	BFU,v1.0	31 390	3	Pm
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	10	TAIR10	27 655	2	AT

表2 7个蔷薇科物种HPL基因基本信息
Table 2 Basic information of HPL genes of 7 species of Rosaceae and *Arabidopsis*

登录号 Accession number	染色体定位 Chromosome location	起始位置 Start position	终止位置 End position	CDs 长度 CDs sequence length/bp	氨基酸序列长度 Amino acid sequence length/bp	分子质量 Molecular mass/ku	理论等电点 Theoretical pI
Pbr041820.1	Chr9	15570321	15574216	1 464	487	54.52	7.57
Pbr028466.1	scaffold471.0.1	333665	335119	1 455	484	53.95	6.73
Pbr039849.1	Chr10	21428388	21429845	1 458	485	53.70	6.47
Pbr020059.1	Chr15	5066810	50688041	1 611	536	59.83	8.76
Pbr008503.1	scaffold1515.0	10067	11521	1 455	484	54.12	6.29
Pbr004466.1	scaffold1205.0	70442	71896	1 455	484	54.01	7.09
MDP0000132456	Chr2	27532816	27534261	1 446	481	53.95	6.73
MDP0000424398	Chr8	3864334	3865987	1 653	550	61.77	8.86
MDP0000225501	Chr8	3879447	3881042	1 596	531	59.72	8.87
MDP0000198152	Chr9	7538386	7541728	1 701	566	63.82	8.47
Prupe.3G213800.1	Chr3	21746035	21748959	1 476	491	64.81	6.91
Prupe.8G110100.1	Chr8	13983746	13985566	1 449	482	54.16	6.53
Prupe.1G386300.1	Chr1	34606454	34609337	1 586	468	52.86	8.63
FvH4_6g42740.1	Chr6	33232547	33235524	1 485	494	54.99	6.72
FvH4_2g07410.1	Chr2	6119731	6121188	1 458	485	54.43	8.48
FvH4_2g07430.1	Chr2	6134269	6143829	3 483	1 160	130.14	6.27
FvH4_2g40510.1	Chr2	28863967	28865544	1 578	525	59.03	8.83
FvH4_5g16260.1	Chr5	9273292	9274746	1 455	484	54.71	7.63
Bras_T02429	S0007	1258091	1259773	1 684	560	63.16	9.02
Bras_T06715	S0033	387692	390586	1 476	491	55.02	6.96
Bras_T16549	S0183	110697	118124	1 590	529	59.06	8.35
Bras_T16553	S0183	131852	133309	1 458	485	54.57	6.77
Bras_T16555	S0183	166589	168034	1 446	481	54.75	7.62
Bras_T16557	S0183	187121	197091	2 919	972	109.10	7.04
PCP010301.1	scaffold00347	231445	233227	1 455	484	54.00	6.48
PCP012365.1	scaffold01388	45459	49137	1 464	487	54.49	6.96
PCP013345.1	scaffold00249	291247	295387	1 845	614	68.05	5.73
PCP044955.1	scaffold01315	31700	35558	1 797	599	67.52	7.55
Pm005761	Chr2	12804834	12806420	1 587	528	59.26	9.10
Pm015123	Chr4	17568415	17571184	1 476	491	54.80	6.48
Pm021564	Chr6	9671420	9672865	1 446	481	54.43	6.77
AT4G15440.1	Chr4	8835368	8838676	1 155	384	42.67	5.64
AT5G42650.1	Chr5	17097564	17099595	1 557	518	58.20	8.75

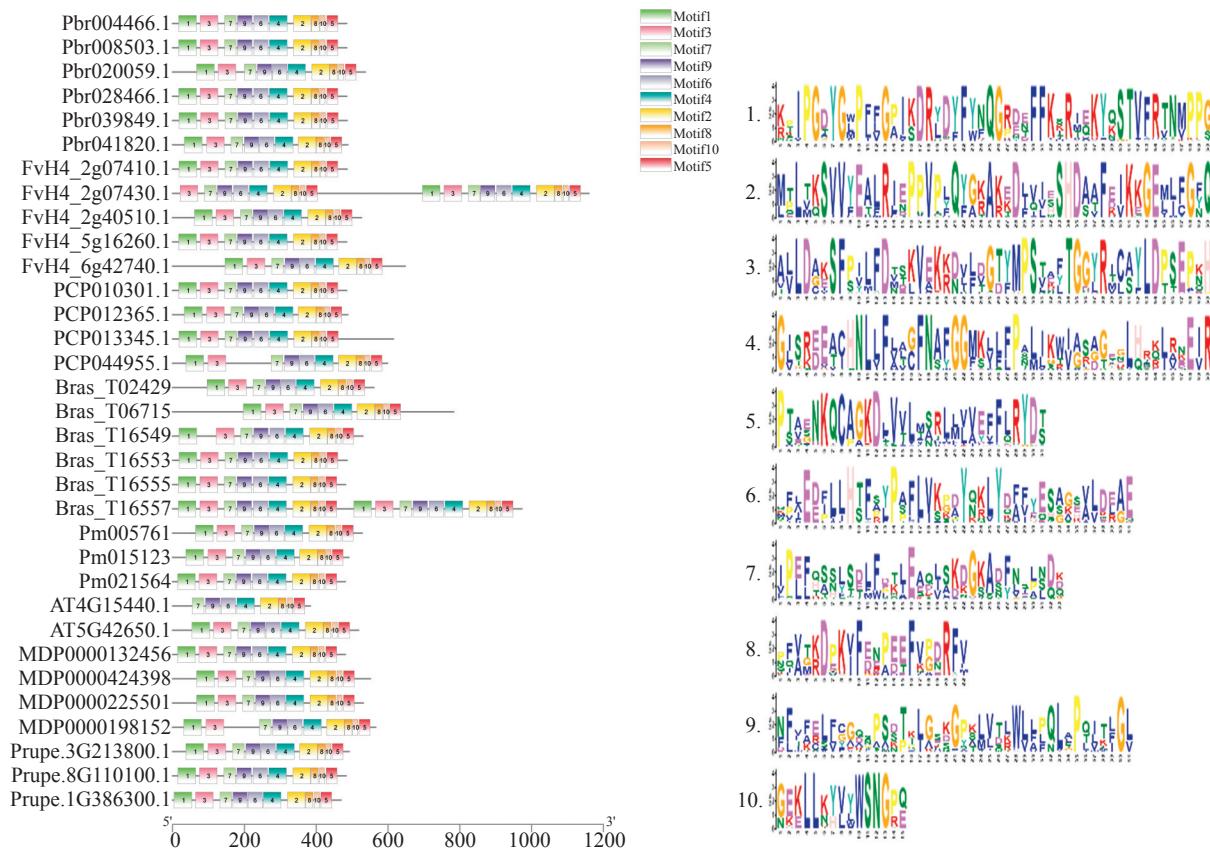


图1 7个蔷薇科物种HPL蛋白motif分析

Fig. 1 Motif analysis of HPL protein in 7 Rosaceae species and *Arabidopsis*

用在线软件 GSDS 2.0 分析所有 *HPL* 基因结构(图 2),并结合表 2 的基因基本信息数据可知,大多数 *HPL* 基因结构简单,主要包含 1 个或 3 个外显子。*HPL* 基因编码区长度在 1 500 bp 左右,草莓 *FvH4_2g07430.1* 和黑树莓 *Bras_T16557* 则有大约 3 000 bp,是 *HPL* 基因序列片段重复了两遍,推测成员扩张主要与片段复制事件相关。

2.3 7个蔷薇科物种HPL基因家族系统发生分析

通过 Phylomatic (<http://phylodiversity.net/phylomatic/>) 可以建立 7 个蔷薇科物种的进化树(图 3)。用 ClustalW 软件对检索获得的蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 蛋白序列进行多序列联配。将多序列联配结果录入 MEGA 6.0 中,构建蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 蛋白序列基因的系统发生树(图 4)。系统发生树将蔷薇科物种和拟南芥 *HPL* 基因分成 3 个亚族,B、C 亚族各含 1 个拟南芥 *HPL* 基因,A、C 亚族含有全部 7 个蔷薇科物种 *HPL* 基因,B 亚族含有 6 个蔷薇科物种 *HPL* 基因。A、B 亚族除了序列 *PCP013345.1*、*FvH4_2g07430.1*、*Bras_T16557*、*Bras_T16549* 均只含 1 个外显子,并且长度大都小于

2 kb,C 亚族除了 *AT4G15440.1*、*PCP044955.1* 和 *MDP0000198152* 均含 3 个外显子,并且长度在 3 kb 左右。

2.4 7个蔷薇科物种HPL基因家族正选择作用分析

首先通过 M3 模型对 M0 模型来检测每组密码子替换位点的选择压力变异情况,然后通过 M7 模型和 M8 模型检验正选择作用。若得到的结果满足:(1)M7 模型和 M8 模型的似然比测验结果基本符合 χ^2 分布。(2)M8 模型下计算出的 ω 值大于 1。(3)通过贝叶斯分析法估计存在正选择作用位点,就能确定该位点的正选择作用显著。通过 *HPL* 系统进化树分析,将 *HPL* 分为 9 个节点即 Node(图 4,表 3)在所有被检验的 9 个节点中,除了 5、6 节点外均满足以上 3 个条件,说明 *HPL* 基因正在经历正选择作用。根据 M8 和 M7 的似然比,2、3 和 8 节点有 95% 以上的概率经历正选择作用,1 和 9 节点有 99% 以上的概率经历正选择作用。

之后通过 codeml 程序中的贝叶斯方法对经历正选择作用的氨基酸位点及其后验概率作检测,并绘制其在序列上分布的散点图(图 5)。结果显示,

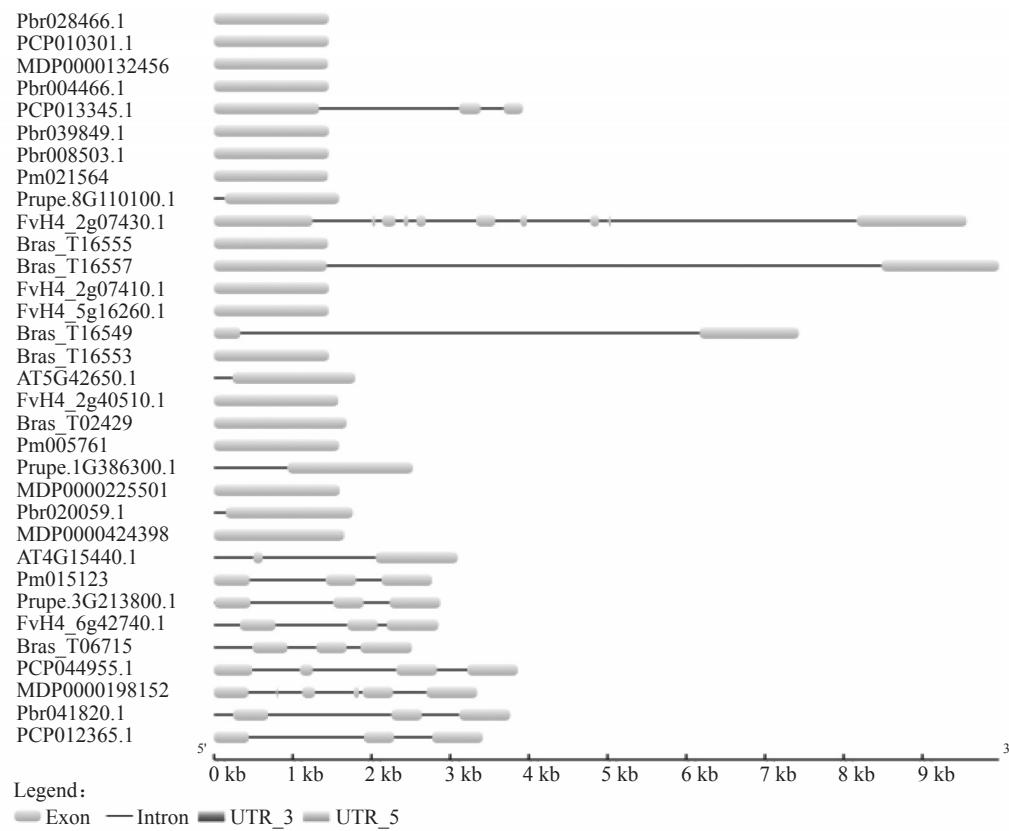


图2 7个蔷薇科物种和拟南芥HPL基因结构

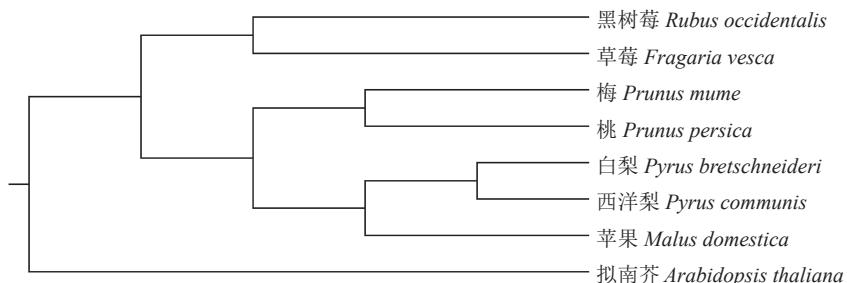
Fig. 2 Structure of HPL genes in 7 species of Rosaceae and *Arabidopsis*

图3 7个蔷薇科物种和拟南芥物种进化树

Fig. 3 The evolutionary tree of 7 Rosaceae species and *Arabidopsis*

所有节点在起始位置均有突变点,除了Node7和Node8外其余节点在最后50 bp的终止位置均有突变点;Node3中间区段没有正选择位点,但其余节点有分布多个正选择作用位点,说明在HPL基因家族的进化过程中,具有正选择效应的点突变起到了不可或缺的作用。

2.5 7个蔷薇科物种HPL基因家族共线性分析

用MCScanX共鉴定出蔷薇科物种两两之间20对共线性关系(表4),其中Pbr041820.1、Pm015123、Prupe.3G213800.1和PCP012365.1两两之间呈共线性关系,Pbr039849.1、Pm021564、Prupe.8G110100.1和PCP013345.1两两之间呈共线性关系,PCP013345.1和Pbr020059.1、Pm005761、Prupe.1G386300.1和MDP0000225501两两之间呈共线性关系,结果显示,梨、苹果、桃和梅HPL基因之间的共线性关系较强。蔷薇亚科(草莓、黑树莓、梅)的分化,要早于苹果亚科(苹果、梨)和李亚科(桃)的分化,总体来说他们物种的分化时间较短。

和PCP013345.1两两之间呈共线性关系,Pbr020059.1、Pm005761、Prupe.1G386300.1和MDP0000424398两两之间呈共线性关系,结果显示,梨、苹果、桃和梅HPL基因之间的共线性关系较强。蔷薇亚科(草莓、黑树莓、梅)的分化,要早于苹果亚科(苹果、梨)和李亚科(桃)的分化,总体来说他们物种的分化时间较短。

2.6 梨和苹果HPL基因表达情况分析

无论是在梨栽培种还是野生种中,共检测到2个HPL基因表达。Pbr020059.1表达都相对较少,在膨大期表达最多,并且栽培种表达量大于野

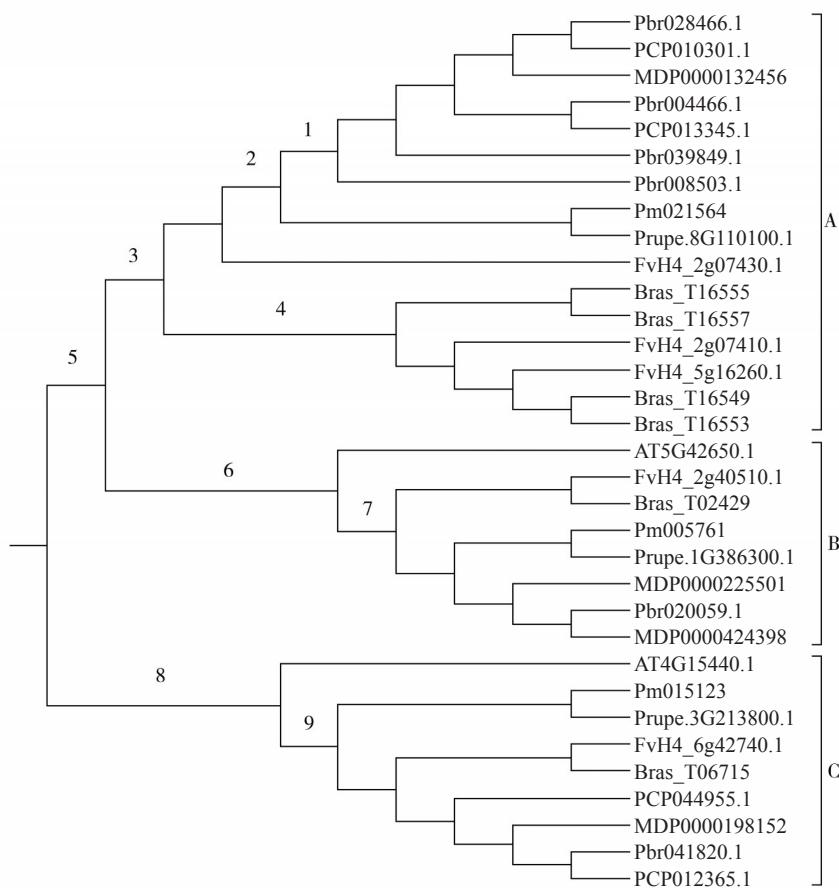


图4 7个蔷薇科物种和拟南芥HPL基因系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of HPL genes in 7 Rosaceae species and *Arabidopsis*

表3 7个蔷薇科物种HPL基因特殊位点的正选择检验

Table 3 Positive selection test for special loci of HPL gene in 7 Rosaceae species

Node	N ^a	dN/dS(ω) under M0 ^b	2△/M3 vs. M0 ^c	2△/M8 vs. M7 ^c	M8 estimates ^d	Positively selected sites ^e
1	7	0.333 60	68.54**	18.12**	p1=0.849 85, ω =3.155 13 p=0.007 48, q=2.893 98	28
2	9	0.220 69	57.80**	7.02*	p1=0.002 77, ω =13.356 89 p=0.160 22, q=0.491 75	9
3	16	0.220 80	188.64**	6.65*	p1=0.007 10, ω =2.199 68 p=0.635 63, q=1.912 34	6
4	6	0.210 99	75.66**	3.14	p1=0.030 76, ω =1.496 06 p=0.597 61, q=2.162 58	8
5	24	0.149 48	323.18**	1.49	p1=0.005 63, ω =1.000 00 p=0.710 45, q=3.444 62	-
6	8	0.084 11	141.58**	0.27	p1=0.004 13, ω =1.000 0 p=0.311 12, q=2.397 76	-
7	7	0.083 63	96.33**	1.78	p1=0.013 92, ω =1.000 0 p=0.156 47, q=1.220 12	7
8	9	0.130 65	79.89**	8.94*	p1=0.020 00, ω =2.109 15 p=0.593 26, q=3.701 68	6
9	8	0.139 12	92.64**	14.21**	p1=0.057 04, ω =1.332 34 p=0.517 89, q=4.123 00	15

注:a. N 为节点中的基因数;b. 通过 M0 模型获得的极大似然估计值;c. M3 和 M0/M8 和 M7 的似然比;*表示卡方测验 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$;d. M8 模型下的极大似然估计值(ω)和正选择位点百分数(p₁);p 和 q 为分布系数;e. 基于 M8 模型, 后验概率 > 0.50 位于正选择作用位点的氨基酸数目。

Note: a. N is the number of genes in the node; b. The maximum likelihood estimation value obtained by the M0 model; c. The likelihood ratios of M3 and M0 / M8 and M7; * indicates the chi-square test $p < 0.05$, ** indicates $p < 0.01$; d. Maximum likelihood estimate (ω) and positive selection site percentage (p₁) under the M8 model; p and q are distribution coefficients; e. Based on the M8 model, number of amino acids at the positive selection effect site with the posterior probability > 0.50 .

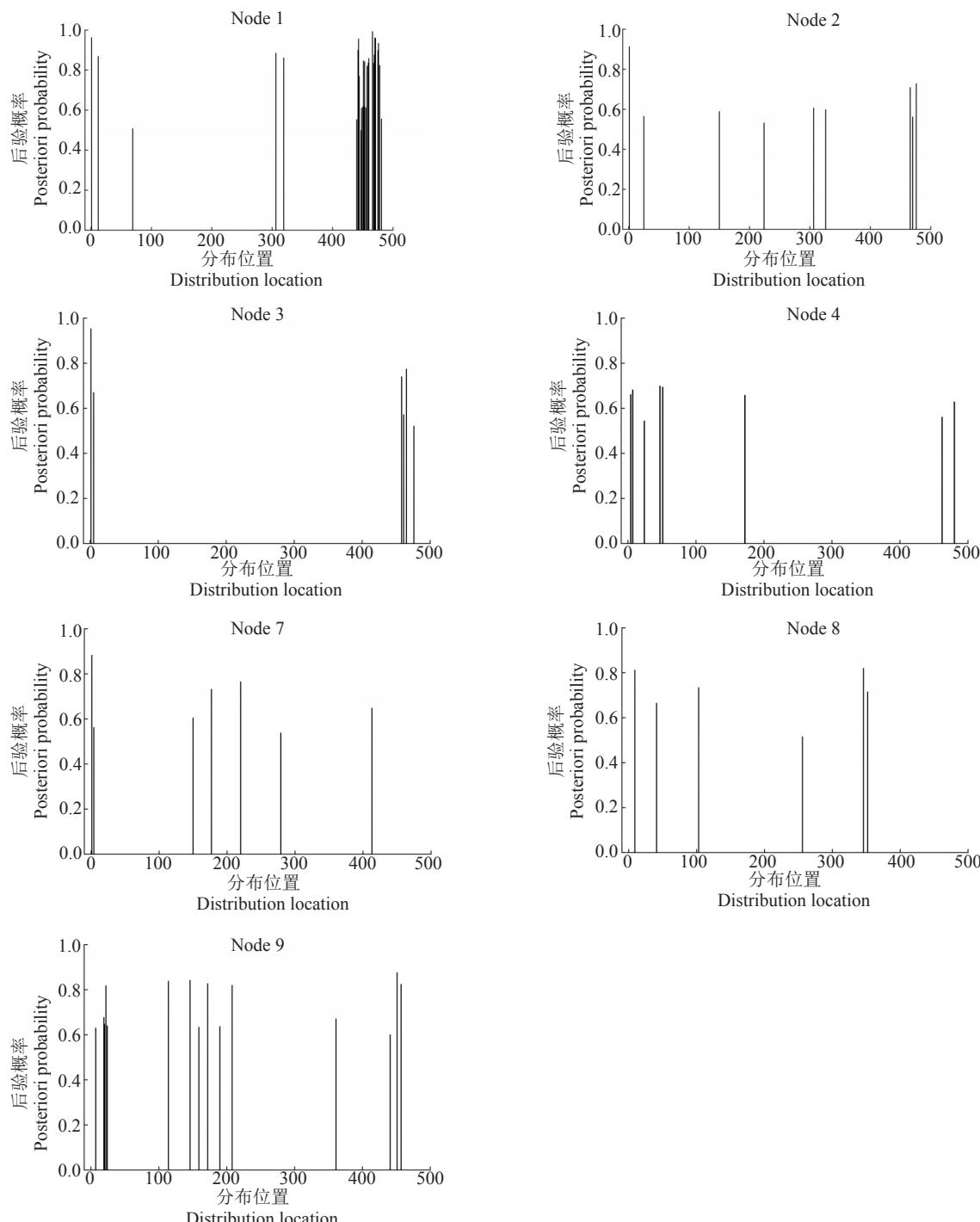


图5 经历正选择作用位点的后验概率在序列上的分布

Fig. 5 Posterior probability distribution diagram of positive selection sites on the sequence

生种(图6-A),而*Pbr041820.1*表达量远大于*Pbr020059.1*。*Pbr041820.1*在栽培种和野生种均在幼果期到膨大期期间下降,膨大期到成熟期期间上升,但野生种在膨大期下降得更多,并且野生种中幼果期表达量最大,而栽培种在成熟期表达量最大。这与野生和栽培品种果实的发育特征是一致的。

苹果中*MDP0000132456*在野生型和栽培型中的表达量均极少(图6-B)。*MDP0000424398*和

*MDP0000225501*都是在幼果期表达最多。而*MDP0000424398*表达量随着果实发育呈下降趋势,栽培种在幼果期到膨大期期间急剧下降,在成熟期表达最低,达到4.23 TPM;而野生种主要在膨大期到成熟期期间急剧下降,并且在成熟期仍然表达,达到45.5 TPM。*MDP0000225501*在野生种和栽培种的表达情况相同,都是先下降后上升。总的来说,苹果野生种栽培种*HPL*表达量相当。

表4 7个蔷薇科物种间的HPL基因共线性关系

Table 4 The collinearity of HPL genes among 7 Rosaceae species

共线性序列1 Synteny sequence 1	染色体 Chromosome	共线性序列2 Synteny sequence 2	染色体 Chromosome
Pbr041820.1	Chr9	Pm015123	Chr4
Pbr041820.1	Chr9	Prupe.3G213800.1	Chr3
Pbr041820.1	Chr9	PCP012365.1	scaffold01388
Pbr039849.1	Chr10	Pm021564	Chr6
Pbr039849.1	Chr10	Prupe.8G110100.1	Chr8
Pbr039849.1	Chr10	PCP013345.1	scaffold00249
Pbr020059.1	Chr15	MDP0000424398	Chr8
Pbr020059.1	Chr15	Pm005761	Chr2
Pbr020059.1	Chr15	Prupe.1G386300.1	Chr1
MDP0000424398	Chr8	Pm005761	Chr2
MDP0000424398	Chr8	Prupe.1G386300.1	Chr1
Pm015123	Chr4	Prupe.3G213800.1	Chr3
Pm015123	Chr4	PCP044955.1	scaffold01315
Pm015123	Chr4	PCP012365.1	scaffold01388
Pm021564	Chr6	PCP013345.1	scaffold00249
Pm021564	Chr6	Prupe.8G110100.1	Chr8
Pm005761	Chr2	Prupe.1G386300.1	Chr1
PCP013345.1	scaffold00249	Prupe.8G110100.1	Chr8
PCP044955.1	scaffold01315	Prupe.3G213800.1	Chr3
PCP012365.1	scaffold01388	Prupe.3G213800.1	Chr3

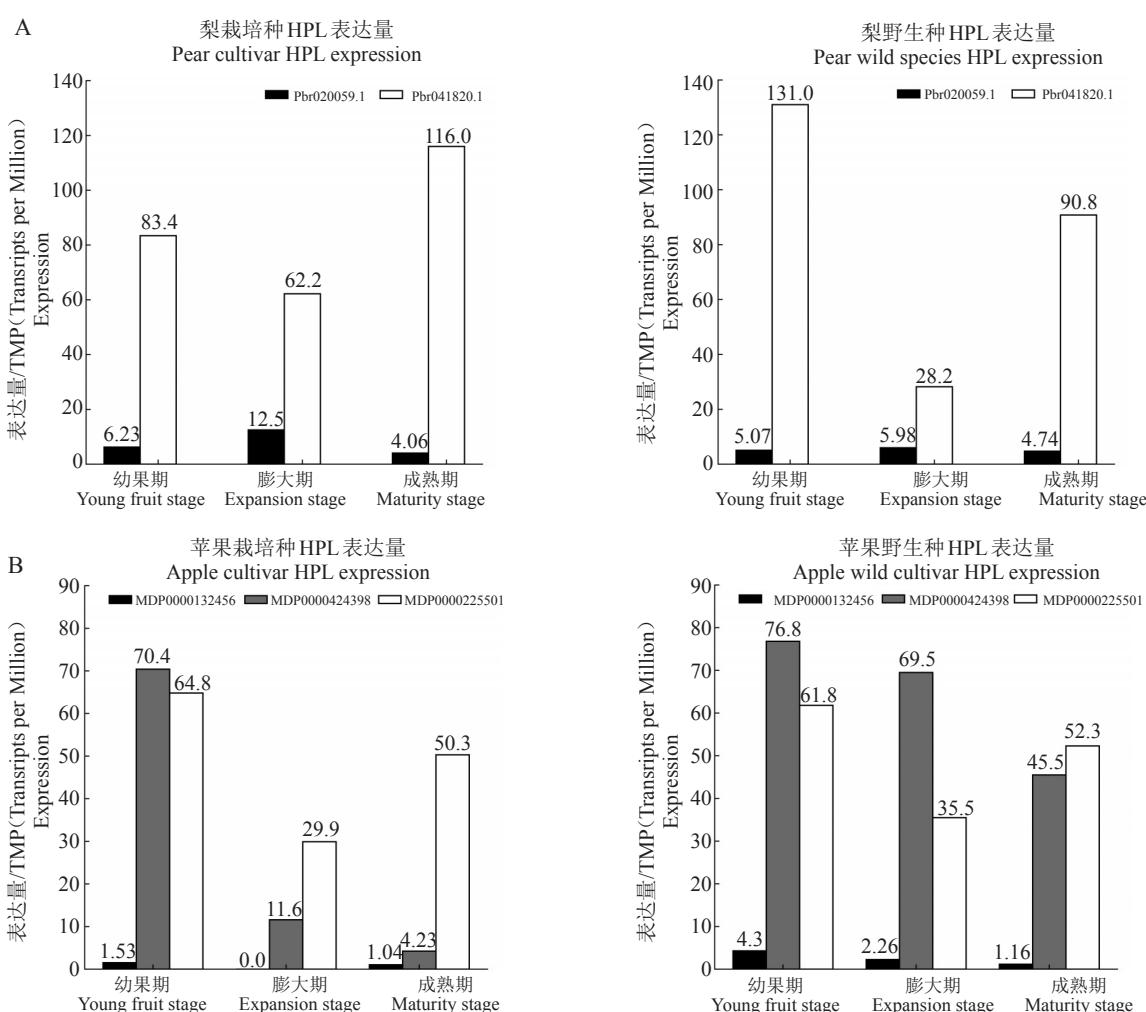


图6 苹果和梨HPL基因表达情况

Fig. 6 Expression of HPL genes in apple and pear

3 讨 论

笔者从7个蔷薇科物种中共鉴定出31条HPL基因,其中白梨6条、苹果4条、桃3条、草莓5条、西洋梨4条、黑树莓6条、梅3条,另外从拟南芥中鉴定2条HPL基因。通过系统进化树发现,HPL基因家族可以分为3个亚族,每个亚族均包含六个以上蔷薇科物种,其中A、C亚族的HPL蛋白大多呈酸性,B亚族的HPL蛋白全部呈碱性,蛋白等电点最低为8.63。通过基因结构发现,A、B亚族主要包含1个外显子,C亚族主要包含3个外显子。并且由于两条拟南芥HPL基因分别位于B亚族和C亚族,说明在拟南芥与蔷薇科物种分化前,HPL就已经分化。

通过蛋白质序列比对分析,总共测定拟南芥及7个蔷薇科物种HPL基因,其中草莓的CDs长度、氨基酸序列长度、分子质量、理论等电点平均值在7种蔷薇科植物中均属最高值,桃的平均理论等电点处于最低点。系统发育树显示不同白梨染色体的基因聚在一起(*Pbr028466.1*、*Pbr039849.1*、*Pbr008503.1*和*Pbr004466.1*)说明白梨HPL可能随着全基因组复制事件而发生复制,而苹果同一染色体的*MDP0000424398*和*MDP0000225501*聚在一起。这与五种蔷薇科植物的LOX基因的分析结果一致^[3],文中发现苹果和白梨LOX基因经历了最近的一次全基因组复制(WGD)。

Motif分析显示,HPL基因家族成员扩张主要与全基因组复制事件相关。用codeml程序分析正选择结果显示,基于M0模型计算 ω 的极大似然估计值,9个节点的结果数据都远小于1,平均数为0.1748,这表明所检测的蔷薇科和拟南芥HPL的序列经历的是纯化选择压力。比较6、7节点和8、9节点发现HPL基因在拟南芥和蔷薇科物种间主要受纯化选择压力的影响,在蔷薇科物种内主要受正选择压力的影响。另外,B亚族主要受到了纯化选择压力的作用,C亚族主要受到了正选择压力的作用。正选择作用位点除在两端有较明显的分布外,还有许多无规律分布的位点,说明在HPL基因家族的进化过程中,具有正选择效应的点突变起到了不可或缺的作用。笔者共发现20对HPL基因之间的共线性关系,其中梨、桃和梅之间存在较强的共线性,进一步证实了HPL基因分化早于蔷薇科物种内

部分化。

*Pbr041820.1*位于C亚族,作为野生和栽培梨上表达活跃的基因,功能上十分活跃。与其他物种基因*Pm015123*、*Prupe.3G213800.1*和*PCP012365.1*也存在共线性,表示这些基因是在物种分化前就已经产生并保持功能活性至今,正选择分析显示其所在的节点上有选择压力变异。苹果的*MDP000042439*也有类似的功能。通过由梨和苹果的表达情况可以发现不同类型的HPL在不同物种和不同亚群间具有表达差异。梨位于C亚族的*Pbr041820.1*表达量远远大于B亚族的*Pbr020059.1*;并且位于A亚族的4个HPL基因完全不表达;苹果位于A亚族的*MDP0000132456*表达量较低,而位于B亚族的*MDP0000424398*,*MDP0000225501*表达较高。基因的表达有很多时空特异性,因此在不同时间和组织中存在差异表达的情况。同时,不表达或者表达量低的基因,其功能可能处于替补和被淘汰的地位。

Chehab等^[32]在水稻中发现不同类型的HPL在不同部位表达也不同,其中OsHPL1普遍表达,OsHPL2在叶和叶鞘中表达,而OsHPL3在伤口诱导和表达。Liu等^[33]和Xin等^[34]分别在黄瓜和茶树中发现面对不同胁迫时HPL表达具有差异,并且在水杨酸SA处理下HPL基因表达量在黄瓜幼苗中升高,而在茶树中降低。表明不同的物种,不同的品种,不同的组织和环境对HPL的表达均有影响。而蔷薇科基因家族分析已经越来越多的被用来帮助解决生物学问题,如研究者研究了9种蔷薇科物种的ABC Transporters,鉴定到MdABCG28作为可能的细胞分裂素对于矮化的作用^[35]。

脂氢过氧化物裂解酶是植物脂氧化途径中脂氧合酶下游的酶,通过催化LOX的产物不饱和脂肪酸裂解,生成草酸和挥发性醛,其中一些醛类化合物是许多水果和蔬菜香气的组成部分。另外,HPL在植物防御中也起着非常重要的作用,与植物的抗伤害、抗逆反应、抗病虫、贮藏和老化等生理进程有关^[11]。HPL在葡萄中能触发细胞死亡相关的防御^[36],野生型番茄HPL能有效防止蚜虫侵害^[37],豌豆幼苗不同阶段HPL表达不同,并且能够激活病原体侵袭的自防御反应^[38]。笔者课题的研究对象是7个蔷薇科HPL基因家族基因,基于序列层面和分子水平的分析,对HPL的起源有了更多的认识,更加

深入地了解基因家族的进化历程,明确自然选择对于其功能的选择作用。

4 结 论

在7个蔷薇科物种白梨、苹果、桃、草莓、西洋梨、黑树莓、梅中,共鉴定到31个HPL基因家族成员,大多包含1个或3个内含子,其结构在进化过程中具有较高的保守性;通过系统进化分析将家族成员分为A、B和C3个亚族;梨、苹果、桃和梅HPL基因间存在较强的共线性关系;进化树上9个节点M0模型的 ω 都远小于1,平均数为0.1748,正选择作用明显;梨和苹果果实中检测到HPL基因表达,MDP0000424398、MDP0000225501和Pbr041820.1为表达活跃的功能基因。梨主要表达的HPL基因属于C亚族,苹果主要表达的HPL基因属于B亚族。

参考文献 References:

- [1] LARA I, MIRÓ R M, FUENTES T, SAYEZ G, GRAELL J, LÓPEZ M L. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions [J]. Postharvest Biology & Technology, 2003, 29(1): 29-39.
- [2] CHERVIN C, SPEIRS J, LOVEYS B, PATTERSON B D. Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh[J]. Postharvest Biology & Technology, 2000, 19(3): 279-285.
- [3] LI M, LI L, DUNWELL J M, QIAO X, LIU X, ZHANG S. Characterization of the lipoxygenase (LOX) gene family in the Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and comparison with other members of the Rosaceae[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 444.
- [4] HORNOSTAJ A R, ROBINSON D S. Purification of hydroperoxide lyase from cucumbers[J]. Food Chemistry, 1999, 66(2): 173-180.
- [5] WAN X H, CHEN S X, WANG C Y, ZHANG R R, CHENG S Q, MENG H W, SHEN X Q. Isolation, expression, and characterization of a hydroperoxide lyase gene from cucumber[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(11): 22082-22101.
- [6] ONO E, HANDA T, KOEDUKA T, TOYONAGA H, TAWFIK M M, SHIRAISHI A, MURATA J, MATSUI K. CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*) [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 98(1): 112-118.
- [7] XU Q, XU X Q, YU K J, ZHU B Q, LAN Y B, DUAN C Q, PAN Q H. Varietal dependence of GLVs accumulation and LOX-HPL pathway gene expression in four *Vitis vinifera* wine grapes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(11): 1924.
- [8] ESPINO-DÍAZ M, SEPÚLVEDA D R, GONZÁLEZ-AGUILAR G, OLIVAS G I. Biochemistry of apple aroma: A review[J]. Food Technology & Biotechnology, 2016, 54(1): 375-397.
- [9] MATSUI K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(3): 274-280.
- [10] VICK B A, ZIMMERMAN D C. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedlings[J]. Plant Physiology, 1976, 57(5): 780-788.
- [11] 赵凌, 沈文飚, 翟虎渠, 万建民. 植物的脂氢过氧化物裂解酶[J]. 植物生理学报, 2004, 40(2): 135-140.
- ZHAO Ling, SHEN Wenbiao, ZHAI Huqu, WAN Jianmin. Hydroperoxide lyase in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2004, 40(2): 135-140.
- [12] PORTA H. Plant lipoxygenases, physiological and molecular features[J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 15-21.
- [13] MATSUI K, SHIBUTANI M, HASE T, KAJIWARA T. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B) [J]. Febs Letters, 1996, 394(1): 21-24.
- [14] BATE J N. Molecular Characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible[J]. Plant Physiology, 1998, 117(4): 1393-1400.
- [15] MATSUI K, UJITA C, FUJIMOTO S-H, WILKINSON J, HITT B, KNAUF V, KAJIWARA T, FEUSSNER I. Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber[J]. Febs Letters, 481(2): 183-188.
- [16] VANCANNEYT G, SANZ C, FARMAKI T, PANEQUE M, ORTEGO F, CASTANERA P, SANCHEZ-SERRANO J J. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(14): 8139-8144.
- [17] WU J, WANG Z W, SHI Z B, ZHANG S, MING R, ZHU S L, KHAN A, TAO S T, KORBAN S, WANG H, CHEN N, NISHIO T, XU X, CONG L, QI K J, HUANG X S, WANG Y T, ZHAO X, WU J Y, ZHANG S L. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Genome Research, 2012, 23(2): 396-408.
- [18] VELASCO R, ZHARKIKH A, AFFOURIT J, DHINGRA A, CESTARO A, KALYANARAMAN A, FONTANA P, BHATNAGAR S, TROGGIO M, PRUSS D, SALVI S, PINDO M, BALDI P, CASTELLETTI S, CAVAIUOLO M, COPPOLA G, COSTA F, COVA V, RI A, VIOLA R. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. Nature Genetics, 2010, 42(10): 833-839.
- [19] VERDE I, JENKINS J, DONDINI L, MICALI S, PAGLIARANI G, VENDRAMIN E, PARIS R, ARAMINI V, GAZZA L, ROSSINI L, BASSI D, TROGGIO M, SHU S, GRIMWOOD J,

- TARTARINI S, DETTORI M T, SCHMUTZ J. The peach v2.0 release: high-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 225.
- [20] EDGER P, VANBUREN R, COLLE M, POORTEN T, WAI C, NIEDERHUTH C, ALGER E, OUS S, ACHARYA C, WANG J, CALLOW P, MCKAIN M, SHI J H, COLLIER C, XIONG Z Y, MOWER J, SLOVIN J, HYTONEN T, JIANG N, KNAPP S. Single-molecule sequencing and optical mapping yields an improved genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) with chromosome-scale contiguity[J]. *Gigascience*, 2018, 7(2): 1-7.
- [21] CHAGNÉ D, CROWHURST R, PINDO M, THRIMAWITHANA A, DENG C, IRELAND H, FIERS M, DZIERZON H, CESTARO A, FONTANA P, BIANCO L, LU A, STOREY R, KNABEL M, SAEED M, MONTANARI S, KIM Y, NICOLINI D, LARGER S, VELASCO R. The draft genome sequence of European pear (*Pyrus communis* L. ‘Barlett’) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e92644.
- [22] VANBUREN R, BRYANT D, BUSHAKRA J, Vining K, EDGER P, ROWLEY E, PRIEST H, MICHAEL T, LYONS E, FILICHKIN S, DOSSETT M, FINN C, BASSIL N, MOCKLER T. The genome of black raspberry (*Rubus occidentalis*) [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2016, 87(6): 535-547.
- [23] ZHANG Q, CHEN W, SUN L, ZHAO F, HUANG B, YANG W, TAO Y, WANG J, YUAN Z, FAN G, XING Z, HAN C, PAN H, ZHONG X, SHI W, LIANG X, DU D, SUN F, XU Z, HAO R, LV T, LV Y, ZHENG Z, SUN M, LUO L, CAI M, GAO Y, WANG J, YIN Y, XU X, CHENG T, WANG J. The genome of *Prunus mume* [J]. *Nature Communications*, 2012, 3(1): 1318.
- [24] MARCHLER A, BO Y, HAN L, HE J, LANCZYCKI C, LU S, CHITSAZ F, DERBYSHIRE M, GEER R, GONZALES N, GWADZ M, HURWITZ D, LU F, MARCHLER G, SONG J, THANKI N, WANG Z, YAMASHITA R, ZHANG D C, BRYANT S. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 45(1): 200-203.
- [25] HU B, JIN J, GUO A Y, ZHANG H, LUO J, GAO G. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2014, 31(8): 1296.
- [26] BAILEY T L, NADYA W, CHRIS M, LI W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(11): 369-373.
- [27] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [28] YANG Z, WONG W, NIELSEN R. Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2005, 22(4): 1107-1118.
- [29] MIKITA S, DAVID T, PEER B. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(1): 609-612.
- [30] YANG Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [31] TANG H, BOWERS J E, WANG X, MING R, ALAM M, PATERSON A. Synteny and collinearity in plant genomes [J]. *Science*, 2008, 320(5875): 486-488.
- [32] CHEHAB E, RAMAN G, WALLEY J, PEREA J V, GOPALAN B, THEG S, DEHESH K. Rice HYDROPEROXIDE LYASES with unique expression patterns generate distinct aldehyde signatures in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(1): 121-134.
- [33] 刘苗苗, 张然然, 魏文霞, 张婷婷, 陈书霞. 黄瓜脂氢过氧化物裂解酶基因 13-CsHPL 的克隆及其表达分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(21): 6907-6914.
- LIU Miaomiao, ZHANG Ranran, WEI Wenxia, ZHANG Tingting, CHEN Shuxia. Cloning and expression analysis of hydroperoxide lyase gene 13-CsHPL in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(21): 6907-6914.
- [34] 辛肇军, 孙晓玲, 张正群, 陈宗懋. 茶树脂氢过氧化物裂解酶基因 CsiHPL1 的克隆及表达 [J]. 植物研究, 2013, 33(1): 68-74.
- XIN Zhaojun, SUN Xiaoling, ZHANG Zhengqun, CHEN Zongmao. Cloning and expression analysis of tea hydroperoxide lyase gene CsiHPL1 [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2013, 33(1): 66-74.
- [35] FENG Y, SUN Q, ZHANG G, WU T, ZHANG X, XU X, HAN Z, WANG Y. Genome-wide identification and characterization of ABC transporters in nine rosaceae species identifying Md-ABCG28 as a possible cytokinin transporter linked to dwarfing [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5783.
- [36] AKABERI S, WANG H, CLAUDEL P, RIEMANN M, HAUSE B, HUGUENEY P, NICK P. Grapevine fatty acid hydroperoxide lyase generates actin-disrupting volatiles and promotes defence-related cell death [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(12): 2883-2896.
- [37] LI J, CARLOS A, DENISE T, HARRY K, FIONA G. A comparison of the effects of FATTY ACID DESATURASE 7 and HYDROPEROXIDE LYASE on plant-aphid interactions [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1077.
- [38] MUKHTAROVA L S, MUKHITOVA F K, GOGOLEV Y V, GRECHKIN A N. Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(4/5): 356-364.